

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Е.В.Кравченко

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДНОГО АНАЛОГА ДЕРМОРФИНА - P-11

Научно-фармацевтический центр
ОАО «Белмедпрепараты»

Изучено влияние синтетического аналога дерморфина, агониста μ - и δ - опиатных рецепторов, пептида P-11, на апоморфиновую стереотипию у мышей. Исследуемый пептид, вводимый в дозах 1 и 10 мкг/кг, способствует достоверному увеличению латентного периода вертикализации, существенно уменьшает продолжительность апоморфиновой стереотипии, вызывает значимое снижение вертикальной активности. Полученные данные свидетельствуют о наличии у P-11 потенциальных нейролептических свойств.

Проблема поиска активных фармакологических средств для лечения шизофрении находится в центре внимания ученых многих стран. Это связано с большой распространенностью заболевания, вызываемым им высоким уровнем инвалидизации и, соответственно, значительным бременем для общества. Нейролептики составляют одну из основных групп современных психотропных препаратов, предназначенных для лечения шизофрении и других психических заболеваний. Поскольку имеющиеся ныне препараты имеют определенные недостатки (наличие экстрапирамидных расстройств при приеме типичных неролептиков, недостаточно выраженная антипсихотическая активность атипичных нейролептиков), весьма актуален поиск новых активных лекарственных средств с минимальными побочными эффектами [1].

Для выявления возможного нейролептического эффекта в программе скрининга психотропных веществ широко используется антагонизм с апоморфином, основанный на повышении дофаминергической нейротрансмиссии в мезолимбиче-

ской системе [1, 3]. Предложенный Protais e.a. (1984) высокочувствительный тест антагонизма со стереотипной апоморфиновой вертикализацией у мышей широко используется для поиска нейролептиков среди пептидных соединений [1,2]. Данный тест имеет большее прогностическое значение, чем тест апоморфиновой стереотипии у крыс, поскольку угнетение феномена вертикализации отмечается после введения как типичных, так и атипичных нейролептиков [1].

Фармакологические исследования активности нейропептидов показали важную регуляторную роль этих соединений в отношении процессов, связанных с высшей нервной деятельностью [2,6,7]. Начиная с 50-х годов прошлого века появились сообщения об исследованиях по применению нейропептида вазопрессина для лечения психических заболеваний, в частности, шизофрении [7]. В настоящее время потенциальные нейролептические свойства выявлены у ряда других пептидов – холецистокинина, нейротензина (табл. 1.) [2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 12]. Вместе с тем, наиболее убедительные доказательства наличия нейролептической активности получены для опиоидных пептидов. Экспериментальные данные свидетельствуют о способности фрагментов β -эндорфина проявлять нейролептическую (фрагмент 6-17) или стимулирующую дофаминергическую систему активность (фрагменты 2-9 и 2-16) [6, 11, 12]. Сходство поведенческих реакций, вызываемых β -эндорфином и нейролептиками, подтверждается данными, показывающими, что нейролептики связываются с опиатными рецепторами, а в стриатуме, характеризующемся наибольшей концентрацией дофаминовых рецепторов, обнаружена высокая степень связывания с опиатами [10]. Полагают, что β -эндорфин может играть роль эндогенного нейролептика, поскольку вызывает у крыс устраняемое налоксоном состояние кататонии, сходное с таковым при кататонической шизофрении у человека, а избыточное количество β -эндорфина в спинно-

мозговой жидкости может иметь отношение к этиологии шизофрении [10]. Имеются данные о наличии у другого представителя семейства опиоидных пептидов — дерморфина — эффектов, характерных для соединений с нейролептической активностью (седация, каталепсия, гипотермия, снижение тонуса мышц, нарушение координации движений, снижение эмоционального реагирования) [2]. На основании приведенных данных можно предположить наличие нейролептической активности и у структурного аналога дерморфина, соединения Р-11. Пентапептид Р-11 характеризуется устойчивостью к действию протеолитических энзимов благодаря наличию в его структуре правовращающей аминокислоты (D-Ala) и обладает выраженной психотропной активностью при системном введении. Ранее нами было установлено, что Р-11 в широком диапазоне доз снижает проявления агрессивности у животных, оказывает достоверное дозозависимое влияние на поведенческие и в меньшей степени судорожные эффекты коразола [4, 5]. Подобная мультифункциональность эффектов характерна для многих пептидов и является одним из характерных признаков их центрального действия [6].

Целью настоящей работы явилось изучение потенциального нейролептического действия у структурного аналога дерморфина, пептида Р-11 (агониста μ - и δ -опиатных рецепторов) в тесте апоморфиновой вертикализации у мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на экспериментальной базе кафедры фармакологии БГМУ под руководством проф. Дубовика Б.В.

Опыты проведены на белых нелинейных мышах-самцах. Изучалась способность пептида Р-11 ослаблять стереотипное поведение мышей, вызванное введением агониста дофаминовых рецепторов — апоморфина.

Исследовали выраженность вертикализации (climbing-реакции), индуцированной апоморфином (2,5 мг/кг, подкожно).

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы. Мышам первой группы вводили за 20 минут до начала эксперимента дистиллированную воду (плацебо) внутрибрюшинно, апоморфин инъецировали непосредственно перед началом опыта. Животным второй группы вводили пептид Р-11 в дозе 1 мкг/кг внутрибрюшинно за 20 минут до введения апоморфина. Мышам третьей группы инъецировали Р-11 в дозе 10 мкг/кг по аналогичной схеме. Животные контрольной группы получали в тех же условиях плацебо. Немедленно после введения апоморфина животных помещали в клетку из вертикально укрепленных проволочных стержней диаметром 2 мм. Инъекция апоморфина индуцировала стереотипную вертикализацию и вскарабкивание мышей по стержням. Позиция животного оценивалась в баллах: 0 баллов — животное находится на полу клетки, 1, 2 и 3 балла — соответственно, 1, 2 или 3 лапки мыши находятся на стержне; 4 балла — животное висит, цепляясь всеми четырьмя лапками за проволочный стержень. Регистрация поведенческих реакций проводилась на протяжении 1 часа. Каждые 2 минуты фиксировалось положение животного. Отмечали латентный период начала вертикализации (критерием являлись две подряд реакции, оцениваемые 4 баллами); латентный период окончания вертикализации (критерием служили две последовательно повторившиеся заключительные реакции, оцениваемые 4 баллами) и продолжительность вертикализации (временной интервал между началом и окончанием climbing-реакции). Поведение животных оценивали в фиксированные периоды — 0-20 мин., 20-40 мин. и 40-60 мин. с момента высадки животного на решетку. Интенсивность антиапоморфинового эффекта пептида оценивали, учитывая общее число баллов за период наблюдения и частоту регистрации реакции, оцениваемой 4 баллами. Максимально возможная частота такой реакции в условиях регистрации с интервалом 2 мин. составляет 30 — за 60 мин. или 10 — за 20 ми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемый пептид Р-11, введенный в дозах 1 и 10 мкг/кг, отодвигает наступление и снижает продолжительность апоморфиновой вертикализации. У 80% животных, которым вводился апоморфин, индукция стереотипной climbing-реакцию регистрировалась уже на 2-4 минуты наблюдения. Введение Р-11 существенно отодвигает сроки наступления апоморфиновой вертикализации. В указанный период времени у 95% животных, которым вводили Р-11 в дозе 10 мкг/кг, стереотипная вертикализация не регистрируется ($p < 0,025$). Предварительное введение Р-11 в дозе 1 мкг/кг оказывает менее выраженный эффект – вертикализация в названные сроки наблюдается у 50% животных. Латентный период вертикализации составляет в контрольной группе $3,6 \pm 0,7$ мин. Этот же показатель в группе животных, получавших апоморфин на фоне введения Р-11 в дозе 1 мкг/кг, составляет $8,7 \pm 2,8$ мин ($p < 0,05$), а на фоне введения Р-11 в дозе 10 мкг/кг – $11,1 \pm 2,2$ мин ($p < 0,002$). Продолжительность вертикализации у животных, которым вводили апоморфин, составляет $40,6 \pm 3,2$ мин. Предварительное введение пептида Р-11 в дозе 1 мкг/кг способствует снижению этого показателя до $32,0 \pm 8,4$ мин. Назначение Р-11 в дозе 10 мкг/кг в аналогичных условиях приводит к двукратному снижению продолжительности индуцированной апоморфином вертикализации: указанный показатель равен $21,4 \pm 6,9$ мин ($p < 0,02$), (табл.2).

Следует отметить, что наиболее выраженное антиапоморфиновое действие пептида Р-11 отмечено в первые 20 мин тестирования (табл.3). Максимальный эффект в эти сроки отмечается в случае введения исследуемого пептида в дозе 10 мкг/кг: частота регистрации реакции, оцениваемой 4 баллами, снижается вдвое – от $8,4 \pm 1,1$ до $4,4 \pm 2,3$ ($p < 0,01$).

Обсуждение.

В последние десятилетия установлена регулирующая роль нейропептидов, действие которых направлено на оптимизацию и нормализацию измененного состояния нейрохимического баланса в моз-

ге. Вызываемые пептидами и их селективно действующими фрагментами изменения в медиаторных процессах способствуют регуляции центральных функций организма [3, 6].

Полученные нами данные свидетельствуют о наличии у пептида Р-11 потенциальной нейролептической активности. В настоящем исследовании установлено, что Р-11 оказывает антиапоморфиновое действие, наиболее выраженное при использовании дозы 10 мкг/кг. Ранее нами было продемонстрировано отсутствие токсического действия у Р-11 в дозах, на 2-3 порядка превышающих уровень активных доз (1000-10000 мкг/кг) [4, 5]. В отличие от применяемых в настоящее время нейролептиков, Р-11 не вызывает неврологических нарушений, не оказывает негативного влияния на процессы памяти у животных.

Экспериментально установленная высокая активность, быстрая реализация эффектов, близость эндогенным структурам и низкая токсичность исследуемого соединения обосновывают перспективность дальнейшего широкого фармакологического изучения исследованного структурного аналога дерморфина. Актуальной является экстраполяция полученных данных и выявление основных точек потенциального медицинского приложения пептида Р-11.

ВЫВОДЫ

1. Пентапептидный аналог дерморфина Р-11 дозозависимо препятствует развитию индуцируемой апоморфином вертикализации у мышей. Р-11 отодвигает наступление и снижает продолжительность и интенсивность апоморфиновой стереотипии.

2. Перспективным представляется дальнейшее изучение Р-11 с целью создания на его основе лекарственного препарата с потенциальной нейролептической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко Н.А. Поиск нейролептиков на основе анализа дофаминзависимого нарушения когнитивных функций. Автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук. М., 1992.
2. Гречко А.Т., Сумина Э.Н., Спивакова Р.П., Басиева Т.С., Бахланова И.В. Фармако-физиологическое изучение эффектов дерморфина и его аналогов. // Фармакологические аспекты обезболивания. Тез. докл. Всесоюзной конф. Л., 1983.- С. 89.
3. Гузевых Л.С., Емельянова Т.Г., Зайцева Н.И., Бондаренко Н.А., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Воронина Т.А. Профиль нейролептической активности нового производного пролил-тирозина ГЗР-123. //Роль нейромедиаторов и регуляторных пептидов в процессах жизнедеятельности. Минск, 1999. – С. 50-52.
4. Дубовик Б.В., Кравченко Е.В. Нейротропные пептиды: перспективы разработки новых психотропных средств.// Тез. докл. Международн. научн. конф. «Новые лекарственные средства: синтез, технология, фармакология, клиника». Минск, 2001. - С. 43-44.
5. Дубовик Б.В., Кравченко Е.В. Влияние пентапептидного аналога дерморфина на поведение животных в модельных экспериментах.// Тез. докл. Международн. научн. конф. «Новые лекарственные средства: синтез, технология, фармакология, клиника». Минск, 2001. - С. 44-45.
6. Клуша В.Е. Пептиды-регуляторы функций мозга. Рига: "Зинатне", 1984. – 146 с.
7. Папсуевич О.С., Чипенс Г.И., Михайлова С.В. Нейрогипофизарные гормоны. Рига: "Зинатне", 1986. - 283 с.
8. Deigin V.I., Yarova E. USA Patent 6184208. Peptide, a method for its preparation and a pharmaceutical composition containing the peptide. February 6, 2001.
9. Forizs L. The use of pitressin in the treatment of schizophrenia with deterioration.//North Carolina Med.J. – 1952. – V.13. – P.76-80.
10. Parviz M.A. Psychopharmacology of morphinomimetic peptides in relation to schizophrenia.//Gen. Pharmacol.- 1978.- V.9.- P.222-222.
11. Van Ree J.M., Inemee H., Louwerens J.W. Non-opiate β -endorphin fragments and dopamine. The neuropeltic-like γ -endorphin fragments interfere with the behavioral effects elicited by small doses of apomorphine. // Neuropharmacology .- 1982. - Vol. 21. - P. 1095-1101.
12. Van Ree J.M. Non-opiate β -endorphin fragments and dopamine. 2. Endorphin 2-9 enhances apomorphine-induced stereotypy following subcutaneous and intrastriatal injection. //Neuropharmacology. - 1982. - Vol. 21. - P. 1103-1109.

SUMMARY

E.V.Kravchenko

EVALUATION OF NEUROLEPTIC ACTIVITY OF THE PEPTIDE ANALOGUE OF DERMORPHINE, P-11

The influence of the synthetic analogue of Dermorphine, peptide P-11 (agonist of μ - and δ -opiate receptors) on apomorphin-induced stereotypy was investigated in the experiments in male mice. The peptide was injected in doses 1 and 10 mkg/kg. P-11 significantly enhanced latency of verticalization (climbing), considerably reduced duration of apomorphin stereotypy and diminished vertical activity. The data obtained confirm potential neuroleptic properties of P-11.

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА Р-11 НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ АПОМОРФИНОВОЙ СТЕРЕОТИПИИ

Группа	ЛП верт, мин	Т верт, мин	Вертикальн. активность, баллы	Частота вертикализации
Апоморфин	3,6±0,7	40,6±3,2	35,3±1,1	8,4±1,1
Р-11, 1,0 мкг/кг+ Апоморфин	8,7±2,8*	32,0±8,4	30,8±2,3	6,3±2,5
Р-11, 10,0 мкг/кг+ Апоморфин, 2,5 мг/кг	11,1±2,2***	21,4±6,9**	23,9±1,2**	4,4±2,3**

Примечание. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,02$; *** - $p < 0,002$

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА Р-11 НА ЧАСТОТУ РЕГИСТРАЦИИ МАКСИМАЛЬНО ВЫРАЖЕННОЙ СТЕРЕОТИПНОЙ РЕАКЦИИ

0,3±0,5⁰⁰ 8,4±1,1 6,3±2,5 4,4±2,3**



Контроль Апоморфин Апоморфин + Р-11 (1,0 мкг/кг) Апоморфин + Р-11 (10,0 мкг/кг)

Примечание. ⁰⁰ - p<0,01, контроль/апоморфин
** - p<0,01, апоморфин/апоморфин+Р-11

Таблица 1. Поиск соединений с нейролептической активностью среди соединений пептидной природы [2, 3, 6, 7, 9 –12]

Соединение
Нейролептическая активность
<i>Вазопрессин</i> (Cys-Tyr-Phe-Glu-Asp-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂) <i>N</i> -ацетил-нейротензин(8-13) (N-alpha-acetyl-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH) <i>Холецистокинин</i> <i>β</i> -эндорфин (6-17) (Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val) <i>ГЗР-123 (синтетический пептид)</i> (N-капроил-L –пролил-L-тирозина метиловый эфир) <i>Дерморфин</i> (Tyr- D-Ala- Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂)
Стимуляция дофаминергической системы
<i>β</i> -эндорфин (2-9) (Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys) <i>β</i> -эндорфин (2-16) (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro)

Таблица 2. Влияние пептида P-11 на продолжительность апоморфиновой стереотипии

Группа	Начало вертикализации, мин	Продолжитель- ность вертикализации, мин	Окончание вертикализации, мин
Апоморфин, 2,5 мг/кг	3,6±0,7	40,6±3,2	44,2±3,0
P-11, 1,0 мкг/кг + Апоморфин, 2,5 мг/кг	8,7±2,8*	32,0±8,4	37,3±8,7
P-11, 10,0 мкг/кг + Апоморфин, 2,5 мг/кг	11,1±2,2***	21,4±6,9**	32,6±6,3

Примечание. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,02$; *** - $p < 0,002$

Таблица 3. Влияние пептида P-11 вертикальную активность мышей в условиях апоморфиновой стереотипии

Группа	N, 0-20 мин	Вертикальная активность (баллы)		
		0-20 мин	20-40 мин	40-60мин
Контроль (плацебо)	0,3±0,5 ⁰⁰	1,7±1,1 ⁰⁰	5,3±1,7 ⁰⁰	4,3±2,6 ⁰⁰
Апоморфин, 2,5 мг/кг	8,4±1,1	35,3±1,1	33,1±2,5	12,1±3,4
P-11, 1,0 мкг/кг + Апоморфин, 2,5 мг/кг	6,3±2,5	30,8±2,3	32,2±3,0	14,7±6,1
P-11, 10,0 мкг/кг + Апоморфин, 2,5 мг/кг	4,4±2,3 ^{**}	23,9±1,2 ^{**}	29,6±4,9	10,3±2,9

Примечание. ⁰⁰ - p<0,01, сравнивались группы: контроль/апоморфин

^{**} - p<0,01, сравнивались группы: апоморфин/апоморфин+P-11 (1,0 и 10,0 мкг/кг)

N – частота реакции, оцениваемой 4 баллами.